

蛍光測定方法と装置及びそれに適した基板

FLUOROMETRY AND FLUOROMETRIC DEVICE

AND SUBSTRATE SUITABLE THEREFOR

5 BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

本発明は、検体の蛍光を測定する測定方法及び装置に関するものであり、特に、ディスク形状の基板の表面の蛍光測定に関するものである。さらには、本発明による蛍光測定に適した基板に関するものである。

10 Related Background Art

生体試料などの微少な物質の測定においては、蛍光による測定は不可欠となっている。微少量の物質を測定する手段は、ラジオアイソトープ、核磁気共鳴など他にも存在するが、感度、標識物質の種類の多さ、取り扱いの容易性、汎用性、検光感度の改良、などの理由から、蛍光法による測定は広く応用されている。

15 蛍光法による測定は、可視化を目的とした細胞や組織の染色だけでなく、定量性を持たせた測定が可能であることから、物質の定量などに応用されている。特に微量物質の検出においては、生体分子の抗原抗体反応や、特定の塩基配列を有するDNAとのハイブリダイゼーションなどの特異的反応と組み合わせ、感度と特異性の高い検出システムを構成することが可能となっている。

20 ところで蛍光を測定する際に必要な要素として、励起光の分離が挙げられる。これは、励起光が検光部に進入しないような工夫を施し、純粋に蛍光のみを測定するということである。

例えば通常の正立型の蛍光顕微鏡ではダイクロイックミラー及びフィルターを装着し、検体より反射または散乱してくる励起光の検光部への進入を防いでいる。

25 蛍光寿命測定装置では蛍光測定時にパルス状の発光光源を使用することによって行っており、また蛍光分光光度計では励起光と検光部の光軸を直角にすることにより励起光の進入を軽減させている。

これらの方法で測定することにより、大部分の励起光は検光部に進入せず、蛍光の測定を行なうことが出来る。しかし、当然のことながら、100%励起光の進入を防ぐことは出来ず、励起光の強度と比較すれば僅かではあるが励起光の検光部への漏れが生じている事も事実である。

5

SUMMARY OF THE INVENTION

比較的検体量が多く蛍光が容易に観察される場合や、蛍光強度が十分に強い蛍光色素を多く含んでいる場合などには、少量の励起光の進入(漏れ光)は問題にならず測定に大きな影響は及ぼさない。すなわち、発せられる蛍光の強度が漏れ光に比べて圧倒的に強く、漏れ光が大勢に影響を及ぼさないからである。

10

しかし、僅かな微弱光を測定する時には、漏れ光が測定に重大な影響を及ぼすこともあり得る。場合によっては、発せられる蛍光よりも、漏れ光の方が多くなってしまう場合もあり得る。

15

その対策として、検光部の前にバンドパスフィルターをはさむなどの対策を施すこともあるが、測定する蛍光が微弱であるため、フィルターを通すことによって本来測定すべき蛍光の光量が不足してしまうなどの弊害もある場合がある。

また多くの色素は励起光と蛍光との波長が近接している場合が多く、蛍光の短波長側の一部と励起光の長波長側の一部が重なってしまうこともあり、波長による厳密な分離は原理的にも困難である。

20

近年、カメラの感度が大幅に上昇しホトンカウティングレベルでの測光も可能となっており、励起光をより効率的に除去し微弱な蛍光の測定が可能となれば応用価値の高いものとなる。

本発明は上記のような問題を解決すること、すなわち励起光の効率的な除去を行なうことを目的とする。

25

すなわち、本発明は、

基板の測定面上の検体に対し励起光を照射し、該検体より発せられた蛍光を測定する方法であって、

該蛍光を測定する検光部への該励起光の進入を防ぐことが可能なように、該励起光照射部と該検光部を設置し、

該検体に対し該励起光を照射した後に、該基板の測定面上の検体を該励起光照射部から該検光部へ相対的に移動させて該検体からの蛍光を測定することの特徴とする蛍光測定方法についてのものである。

好ましくは、前記相対的移動により、前記測定面上に円軌道を形成している、前記記載の蛍光測定方法である。

さらに、前記基板の測定面に垂直な方向に伸びる軸を中心に該基板を回転させることで該測定面の回転面を形成し、前記円軌道を形成し、とりわけ前記測定面の回転面に対して前記励起光照射部と前記検光部を相対的に移動させる前記記載の蛍光測定方法、

あるいは、前記励起光照射部と前記検光部を回転移動させることで前記測定領域の円軌道を形成する前記記載の蛍光測定方法が好ましい。

前記検体が前記基板上に形成されたセルに満たされた液体であり、

あるいは前記検体が前記基板上に固定、吸着、または捕捉された物質であり、さらには、前記検体が、前記基板上に配置されているプローブに固定されていることが好ましい。

また、前記プローブや、前記検体が、DNA、タンパク質、ペプチド核酸(PNA)であることが好ましい。

また、前記励起光照射位置と前記検光部との距離が可変であり、

あるいは、前記検体の移動速度が可変であり速度を変えることによって、前記励起光照射から検光までの時間を適宜調整可能であることが好ましい。

また、前記基板の測定面上の検体が、該基板の中心軸と同心をなす半径が異なる複数の円上またはその弧上に配列され、該検体が前記中心軸からの距離ごとに同一または類似の属性をもち、互いに区別可能な検体群を構成することが好ましい。

また、本発明は、測定面上に蛍光測定対象となる検体を有する基板であって、該検体が該基板の中心軸と同心をなす半径が異なる複数の円上またはその弧上に配列され、該検体が前記中心軸からの距離ごとに同一または類似の属性をもち、互いに区別可能な検体群を構成する基板についてのものである。

5 さらに、本発明は、基板の測定面上の検体に対し、励起光を照射する励起光照射部と、該検体より発せられた蛍光を測定する検光部を有する、蛍光測定装置であって、

該検光部への該励起光の進入を防ぐことが可能なように、該励起光照射部と該検光部が設置されており、

10 該基板の測定面上の検体を該励起光照射部から該検光部へ相対的に移動させる手段を有することを特徴とする蛍光測定装置についてのものであり、前記相対的に移動させる手段として、前記検体を載せた基板を前記励起光照射部及び検光部に対して、前記測定面上に相対的に円軌道を形成しながら移動させる手段を有することが好ましい。

15

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

図 1 は、本発明により提供された蛍光測定装置の図である。

図 2 は、ステージ部分の拡大図である。

図 3 は、励起光照射部と検光部との位置関係を示した図である。

20 図 4 は、蛍光測定装置より得られた検体の蛍光スペクトルである。

図 5 は、4 種のプローブが同心円状にならんだ基板を示す図である。

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

25 本発明による蛍光測定手法及び装置は、検光部を励起光が入らない場所に設置し、検体に対し励起光を照射した後に検体を励起光照射部から検光部に移動させることにより励起光の進入を防ぐ機構を備えたことを特徴とする蛍光測定手法及び装置である。

励起光の光軸と検光部の光軸は完全に異なっており、これにより検光部への励起光の進入は原理的に阻止可能である。しかし、基板内の反射等によるガラス内伝播や散乱などの影響を考慮した場合、以下の対策により励起光の進入阻止をより確実なものにすることができる。

- 5 a) 基板をガラスではなく、黒色のガラスにする。
- b) 励起光照射部と検光部を遮蔽し、空間的に散乱光を遮る。
- c) 基板表面の平面性を高め、励起光を基板に対し垂直に照射し、基板表面の散乱を減少させる。

10 また、当然のことながら、励起光照射部から検光部への移動は、検体に含まれる蛍光色素等の発光寿命の時間的範囲内に行なうことが望ましい。

すなわち、励起光照射により励起された色素は蛍光を発するが、時間経過に伴い蛍光強度は減少する。そのため、励起光照射終了後、少なくとも測定可能な蛍光が発光している時間内に検体を検光部に移動させる。

15 検体の移動は様々な方法がある。検体がディスクの表面に固定化された基板、あるいはディスク上に形成されたセルに入った液状の検体などであれば、ディスクを回転させる事によって容易に検体を移動できる。

20 たとえば回転しているディスクの一ヶ所で励起光を照射し、測定個所がディスクの回転によって移動した後に通過する別の場所に検光部を設置し、そこで測定を行えば良い。検光部は励起された検体から蛍光を発している時間内に通過する位置に設置する。ディスクの回転を続ければ、検体は測定後に再び同じ励起光照射場所において励起され、再度測定することが可能であるため、必要に応じて複数回測定を行ない結果を積算する事も出来る。

25 検体を回転させる事が困難である場合には、検体をある一定の方向に直線的に移動させても良い。この場合励起光照射部と検光部は適当な間隔をおいて設置し、検体を回転させるときと同様に、励起光照射後、検体が蛍光を発している時間内に検体が検光部に到達するように移動させれば良い。

通常は検体を移動させる方が装置の構造上容易である事が多いが、それが困難である場合には、励起光照射部と検光部を検体に対し移動させても良い。

- 5 励起光照射部と検光部は複数設置することも可能である。例えば1箇所では励起光を照射し、複数の場所で異なった条件で測定する事も可能であるし、測定の時間的な効率を考えて、複数の場所で各々並列して測定を行なう事も可能である。

励起光を照射してから検体が検光部を通過するまでの時間は、励起光照射部と検光部の距離と検体の移動速度によって決まってくる。蛍光を発する色素等の種類によって蛍光寿命は異なるため、検体によって励起光照射部と検光部の距離と移動速度を変えられるような装置であれば望ましい。

- 10 本発明による蛍光測定方法は、近年注目されている固相基板を用いた物質検出に応用出来る。固相基板上にDNA、タンパク質等のプローブが存在する基板を検体と作用させた後、蛍光によって検体の測定を行なう場合には、基板上に存在する微量の蛍光物質の測定を行なう必要がある。高感度蛍光測定を行なうためには、励起光の効率的な除去も重要な要素であり、本発明による測定方法によりそれ
- 15 も改善できる。

- また、本発明による蛍光測定装置を、上述の基板を用いた微量測定に利用した場合、基板上の検光部を同心円状にすることで容易に複数種のプローブによる測定が可能となる。すなわち、各プローブは回転中心を中心とした円形のパターンをとり、プローブの種類により、異なる半径で同心円状にプローブを並べた基板
- 20 を用いればよいのである。測定に際しては、回転している基板に対し検光部(通常は対物レンズ)を合わせ測定を行なうが、回転中心からの半径の長さを順に変更することで各プローブに対応した検体の測定を行なうことが出来る。

実施例

(実施例1)

- 25 (1)基板作製

直径が30 mm、厚さ0.5 mmの石英ガラス基板を準備した。基板を回転できるようにするため、基板中央部の直径10 mmの部分は回転駆動の伝達ができるようにした。

5 石英ガラス基板を水で軽く洗浄した後、基板洗浄専用液に浸し20分間超音波洗浄を行なった後、一昼夜そのまま放置した。基板を取り出し、水及び超純水にて洗浄液を洗い流した後、60℃にあらかじめ加熱した1 MのNaOH水溶液に20分間浸した。基板を取り出し、水及び超純水でNaOH水溶液を洗い流し、超純水中で20分間超音波洗浄を行なった。

10 続いて、あらかじめ1%の濃度となるように水に溶解し、約1時間加水分解したシランカップリング剤(信越化学工業社製、商品名KBM603)に基板を1時間浸した。超純水にて軽く洗浄した後、表面に残った水滴を窒素ガスにて飛ばし乾燥させ、120℃のオーブンにて2時間ベークした。このシランカップリング剤をガラス表面に結合させたことでガラス表面にアミノ基が導入された。

(2)色素の結合

15 続いてフナコシ製タンパク質標識用色素、eosin-5-isothiocyanateの1 M NaCl/50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)溶液(濃度50 μ M)2 mlを用意し、ハイブリパック中で基板と10時間反応させた。反応終了後、1 M NaCl/50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)溶液にて基板を洗い、未反応のeosin-5-isothiocyanateを完全に洗い流しeosinが結合した基板1を得た。

20 (3)装置構成

ニコン製蛍光顕微鏡のステージ部分を改造し図1のような測定装置を作製した。ステージ付近の拡大図を図2に示す。励起光照射部分13aと、検光部15である顕微鏡の対物レンズ7はディスクの中心軸をはさみ反対側に設置しており、中心部には基板を回転させるための回転駆動装置を設置した。励起光照射部と検光部15の中心軸からの距離は可変であるが、それぞれ12.5 mmとなるように固定し、中心軸を挟んで反対側に設置した。すなわち、励起光が照射された部分

はディスクが180度回転することによって検光部15へ移動するように設置した。(図3参照)

検光部15である対物レンズ7から得られた光は、顕微鏡5から延ばされた光ファイバー11を経由して、蛍光測定装置12に送られ、そこで解析できるようにした。この蛍光測定装置12はデータの積算が可能であり、得られる蛍光が微弱な場合には積算することで感度を高めることが出来る。

(4)基板測定

先に作製した、eosinの結合した基板1を改造ステージに取り付けた。ディスクの回転速度を30000rpmに設定し、励起光は522nmに設定した。

10 励起光を照射した状態で測定を行ない、十分な感度が得られるまで10秒間測定を続け、基板からの蛍光を積算した。その結果、図4に示すようなスペクトルが得られた。

励起光の波長である522nm付近には、目立ったピークはなく、純粹にeosin由来の蛍光のみが測定された。

15 従って、本発明による蛍光測定方法により励起光を除去して検体の蛍光測定が出来た。

(実施例2)

(1)基板作製

20 直径が30mm、厚さ1mmの石英ガラス基板を準備した。基板を回転できるようにするため、基板中央部の直径10mmの部分は回転駆動の伝達ができるようにした。

25 石英ガラス基板を水で軽く洗浄した後、基板洗浄専用液に浸し20分間超音波洗浄を行なった後、一昼夜そのまま放置した。基板を取り出し、水及び超純水にて洗浄液を洗い流した後、60℃にあらかじめ加熱した1MのNaOH水溶液に20分間浸した。基板を取り出し、水及び超純水でNaOH水溶液を洗い流し、超純水中で20分間超音波洗浄を行なった。

続いて、あらかじめ1%の濃度となるように水に溶解し、約1時間加水分解したシランカップリング剤(信越化学工業社製、商品名KBM603)に基板を1時間浸した。超純水にて軽く洗浄した後、表面に残った水滴を窒素ガスにて飛ばし乾燥させ、120℃のオーブンにて2時間ベークした。このシランカップリング剤をガラス表面に結合させたことでガラス表面にアミノ基が導入されたことになる。

続いて同仁化学社製の架橋剤であるEMCS(N-(6-Maleimido caproyloxy)succinimide)を混合溶媒(エタノール:DMSO 1:1)に10mlあたり3mgの割合で溶解させた。得られたEMCS溶液に先にベークしたガラス基板を浸し、2時間放置した。EMCS溶液より基板を出し、先程と同じ混合溶媒にて軽く洗浄を行なった後、表面の液滴をエタノールに置換し、窒素ガスにて液滴を飛ばし乾燥した。これによりEMCSが基板全面(両面)に結合された基板(EMCS基板)を得た。EMCSはスクシイミド基とマレイミド基を有し、スクシイミド基が基板表面のアミノ基と結合するため、基板表面にはマレイミド基が導入されたことになる。

(2) DNA結合

末端にチオール基(SH基)を結合させた18merの修飾DNA(プローブ)を、BEX社に依頼して合成した。塩基配列は下記に示す配列で、5'末端にSH基を結合させた。

^{5'}HS-ACTGGCCGTCGTTTTACA^{3'}

(配列番号1)

上記DNAを水に溶かし濃度が30μMになるよう調整した。得られたDNA水溶液2mlを先に作製したEMCS基板とともにハイブリパックに封入し、2時間反応を行なった。反応終了後、1M NaCl/50mMリン酸緩衝液(pH7.0)溶液にて基板を洗い、ガラス表面のDNA溶液を完全に洗い流した。その後、2%ウシ血清アルブミン水溶液中に浸し、2時間放置し、ブロッキング反応を行

なった。ブロッキング反応終了後、再び、1 M NaCl/50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)を用いて基板を洗浄し、DNAが結合した基板を得た。

(3) Eosin標識DNAの合成

5 基板に結合させたDNAと相補的な配列を持つ、18 merのアミノリンクDNAをBEX社に依頼して合成した。アミノ基は一般的な5'末端ヘキサメチレンタイプのアミノリンカーを用いた。

アミノリンクDNAにフナコシ製タンパク質標識用色素、eosin-5-isothiocyanateを作用させ5'末端にeosinが結合した標識DNAを得た。標識反応は定法に従って行なった。

10 (4) ハイブリダイゼーション

eosin標識DNAを1 M NaCl/50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に最終濃度1 μ Mとなるように溶解し、得られた溶液2 mlを基板とともにハイブリパックに封入し、ハイブリダイゼーション反応を3時間行なった。

その後、基板を1 M NaCl/50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)溶液にて洗い
15 流し測定対象である基板1を得た。

(5) 基板測定

実施例1で用いた測定装置を用いて、得られた基板1の測定を行なった。ディスクの回転速度は実施例1と同様30000rpmにセットし、励起光は522nmに設定した。

20 励起光を照射した状態で測定を行ない、十分な感度が得られるまで10秒間測定を続け、基板からの蛍光を積算した。その結果、実施例1で得られたスペクトル(図4)と同じ結果が得られた。

実施例1と同様、励起光の波長である522nm付近には、目立ったピークはなく、純粋にeosin由来の蛍光のみが測定された。本発明による蛍光測定方法
25 により励起光を除去して検体の蛍光測定が出来た。

(実施例3)

(1) 基板作製

EMCSが基板全面に塗布されたEMCS基板の作製までは、実施例2の(1)と同様に行ない、直径30mmの基板を得た。

(2)DNA結合

5 末端にチオール基(SH基)を結合させた18merの修飾DNA(プローブ)を、BEX社に依頼して合成した。塩基配列は下記に示す配列で、5'末端にSH基を結合させた。

No. 1: 5'-HS-AC TGGCCGTCGTTTTTACA^{3'}

(配列番号1)

No. 2: 5'-HS-AC TGGCCGTTGTTTTTACA^{3'}

10 (配列番号2)

No. 3: 5'-HS-AC TGGCCGCTTTTTTTACA^{3'}

(配列番号3)

No. 4: 5'-HS-AC TGGCATCTTGTTTTACA^{3'}

(配列番号4)

15 上記DNAをBJプリンター用溶媒であるSGクリア(グリセリン7.5%、尿素7.5%、チオジグリコール7.5%、アセチレノールEH1%を含む水溶液)に溶解し、最終濃度8μMになるよう調整してBJプリンター用カートリッジに充填した。BJプリンターを使用し4種のプローブ16は図5に示すようなパターンで配置した。すなわち、半径14mmの円周上にNo. 1プローブを並べ、半径13mmの円周上にはNo. 2、12mmにはNo. 3、11mmにはNo. 4を同心円状に並べた。(外側から順にNo. 1, No. 2, No. 3, No. 4の順にプローブが同心円状に1mm間隔で並んでいる。)

その後、DNA溶液がのった状態で基板を30分間加湿チャンバー中に放置し、基板とDNAとの反応を行なった。

25 なお、BJプリンターは平板印刷が可能なキヤノン製BJプリンターBJC-600の改造機を使用した。

反応終了後、1 M NaCl/50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)溶液にて基板を洗い、ガラス表面のDNA溶液を完全に洗い流した。その後、2%ウシ血清アルブミン水溶液中に浸し、2時間放置し、ブロッキング反応を行なった。ブロッキング反応終了後、再び、1 M NaCl/50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)を用いて基板を洗浄し、4種のDNAが同心円状に結合した基板を得た。

(3) eosin 標識DNAの合成

基板に結合させたNo. 1のプロープDNAと相補的な配列を持つ、18merのアミノリンクDNAをBEX社に依頼して合成した。アミノ基は通常の5'末端ヘキサメチレンタイプのアミノリンカーを用いた。

アミノリンクDNAにフナコシ製タンパク質標識用色素、eosin-5-isothiocyanateを作用させ5'末端にeosinが結合した標識DNAを得た。標識反応は定法に従って行なった。

(4) ハイブリダイゼーション

実施例2の(4)と同様に行なった。

(5) 基板測定

実施例1で用いた測定装置を用いて、得られた基板1の測定を行なった。ディスクの回転速度は実施例1と同様30000rpmにセットし、励起光は522nmに設定した。

ディスクを回転させた状態で励起光照射位置13aと対物レンズ7の位置を適宜設定し、プロープ16を結合させた部分の蛍光スペクトルを、各プロープごとに順に測定した。その結果、No. 4を除く3つのプロープから蛍光スペクトルが測定された。

極大である560nmの蛍光強度を測定すると、No. 1が2300、No. 2が1400、No. 3が1000の蛍光強度であった。

この結果は塩基配列が一致しているものほど傾向が強くなるという結果となっており、本発明による蛍光測定装置と、プロープを同心円状に並べた基板によって核酸の塩基配列の解析が出来ることが示された。

本発明による蛍光測定方法は、複雑な装置構成を必要とせずに励起光の除去が出来るという利点を持つ。検光部は励起光の進入し得ない場所に設置されているため、完全な励起光の除去が可能となる。

- 5 また本発明の蛍光測定装置に供する検体の形態としてディスク状の基板があるが、基板上に複数のプローブを並べる方式として、回転の中心軸を中心とした半径の異なる同心円状に並べることで、容易に複数のプローブによる検体の測定が可能となった。

(配列表)

配列番号: 1

10 配列の長さ: 1 8

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

15 配列

ACTGGCCGTC GTTTTACA

18

配列番号: 2

配列の長さ: 1 8

20 配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

25 ACTGGCCGTT GTTTTACA

18

配列番号: 3

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

5 トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

ACTGGCCGCT TTTTACA

18

10 配列番号: 4

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

15 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

ACTGGCATCT TGTTTACA

18